

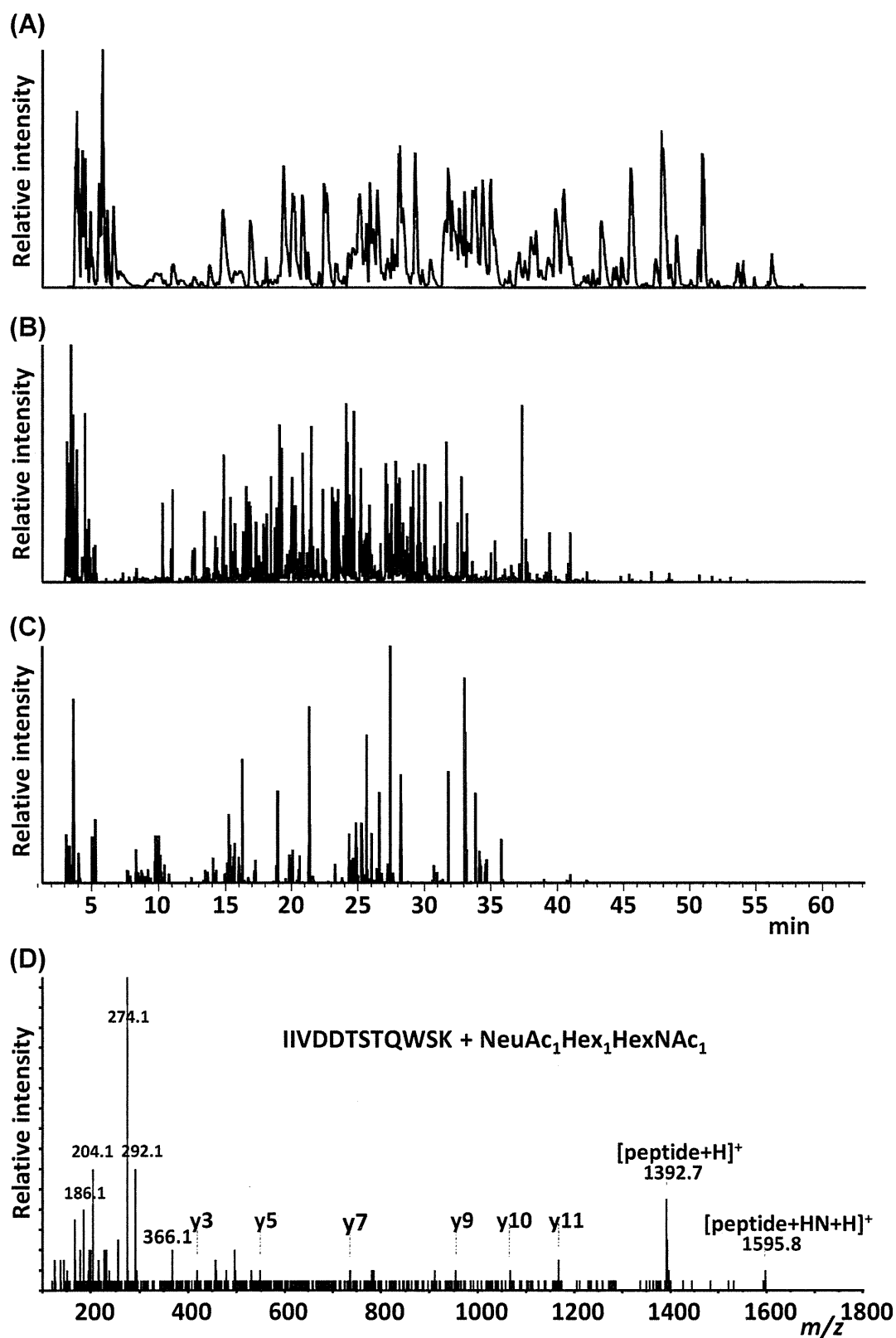


図1. (A) ヒト血液凝固第VIII因子を還元カルボキシル化及びトリプシン消化後した試料のLC/MSのベースピーククロマトグラム, (B) MS/MSのトータルイオンクロマトグラム, (C) MS/MSの m/z 204.1の抽出イオンクロマトグラム, (D) 24.8分に検出された m/z 1175.1 (+2)のO-結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル

1 ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSPFF NTSVVYKKT FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVQV LKENGPMASD PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGVNR SLPGLIGCHR KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLGQFLLCF HISSHQHDM EAYVKVDSQP EEPQLRMKN EEAETDDDL TDSEMDVVRF DDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSQ YLNGPQIRG RYKVKVRFMA YDDETFKTR EIQHESGILG PLYGEVGD TLLIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRP LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFVME RDLASGLIGP LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQSLVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS VFFSGYTFKH KMYEDTLTL PFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYIE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS TRQKQNTATT IPENDIER TD PWFARHTPMP KIQNVSSDL LMLLRQSPTP
 801 HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHERPQ LHHSGDMVFT PESGLQLFLN EKLGTAAATE LK~~KL~~DFKVSS TSNLISTIP SDNLAAGTIN
 901 TSSLGPPSPMP VHYDSQD~~TT~~ LFGKSSPLT ESGGPLSLSE ENNSKLLS GLMNSQESSW GKNVSSSTESG RLFGKRAHG PALLTKDNAL FKVSI~~LL~~KT
 1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSPSVWQ NILESDTEFK KVTPLIHDM LMDHNATLR LNHMSNKTTS SKNMEMVQOK KEGPIPPDAQ NPDMSFFKML
 1101 FLPE~~S~~ARWIQ RTHGKNSLNS GQGSPK~~QLV~~ SLGPEKSVGE QNFLSEKNKV VVGKGEFTKD VGLKEMVFP SRNLF~~LT~~NLD NLHNN~~TH~~NQ EKKIQEEIEK
 1201 KETLIQENVV LQIHVTGT KNF~~M~~KNLFL STRQV~~EG~~S DGAYAPVLD FRSIND~~SIN~~ TKKHTAHFSK KGEENLEGL QN~~DT~~KQIVEK YACTTR~~ISEN~~
 1301 TSQQNFVTQ SKRALQFRL PLEETELEK LIVDDISTQW SKNMKELTPS TL~~TQ~~IDYNEK EK~~GA~~ITQSPL SDCLTRSHSI PQANRSP~~LP~~I AKVSSFP~~SIR~~
 1401 PIYLTRVLFQ INSSHLP~~AS~~ YRK~~KD~~SGVQE SSHFLQ~~GAKK~~ NNL~~SL~~A~~IL~~TL EMTGDQ~~EVG~~ SLGTSATNSV TYK~~V~~ENTVL PKPDL~~PK~~TSG KVELLPKVHI
 1501 YQK~~DL~~FPTET SPGSPGHLDL VEGSLLQ~~TE~~ GAIK~~W~~NEANR PGKVPFL~~VA~~ TESSAKTPSK LLDPLAWDNH YGTQIP~~KEW~~ KSQEK~~SPEKT~~ AFKKKDTILS
 1601 LNACESNHAI AAINEGQNKP EIEVTWAKG RTERLCSQNP PVLKR~~HQ~~REI TRTTLQSDQE EIDY~~DD~~TISV EMKKEDFDI~~Y~~ DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
 1701 AAVRLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQPF KKVVFQ~~EFTD~~ GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
 1801 EPR~~KNFVKEN~~ ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG LIGPLL~~VCHT~~ NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDET~~SKWY~~ FTE~~NMERNCR~~
 1901 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFTVEMLP SKAGIWRVEC
 2001 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
 2101 FIIMYSLDGK KWQTYR~~EN~~ST GTLMVFFGNV DSSGIKH~~NIF~~ NPPIIARYIR LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 2201 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQK~~TMKV~~ TGVTTQGVKS LLTSMYKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDP
 2301 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

N-glycopeptide , ○ : N-glycosylated , ● : Not N-glycosylated , ○ : Not detected

O-linked glycopeptide / , ° : O-glycosylation site , ☐ : Tyrosin sulfation

図2. ヒト血液凝固第八因子の一次配列及び翻訳後修飾

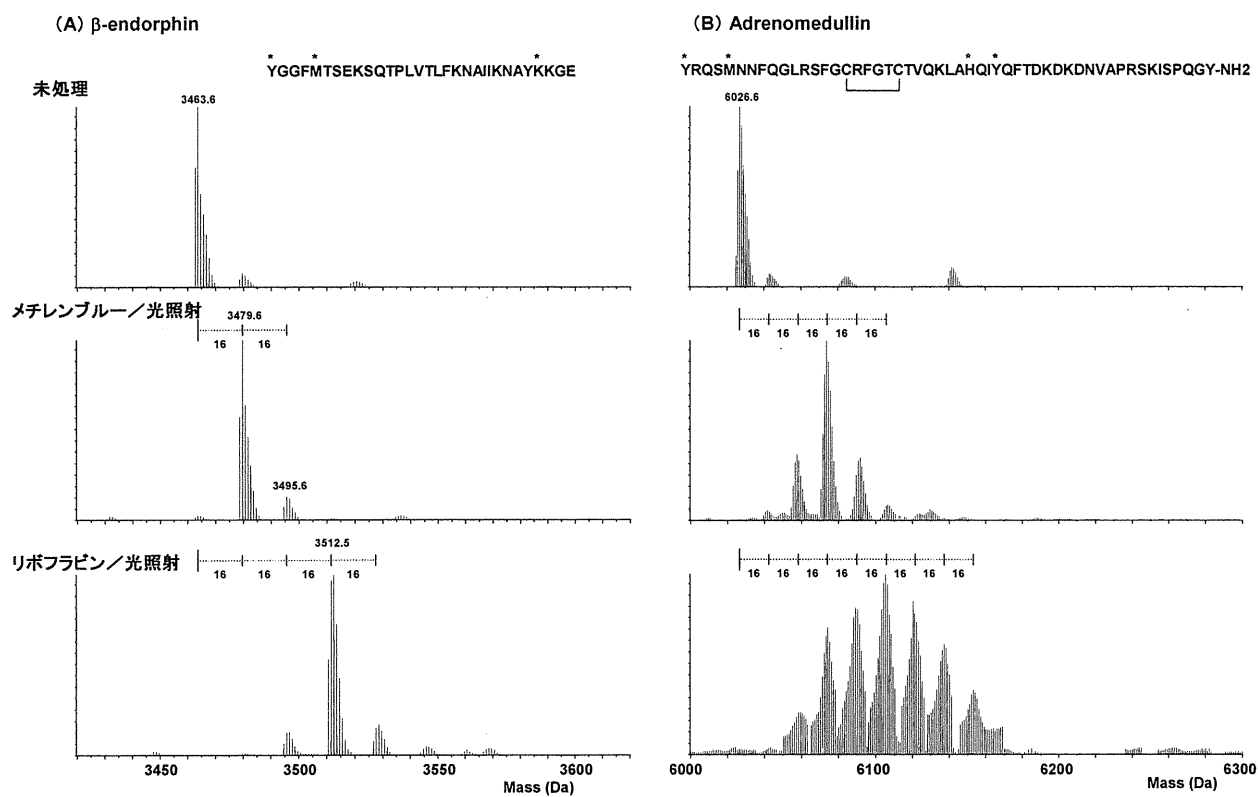


図3. β -エンドルフィン(A)及びアドレノメデュリン(B)をメチレンブルー／光照射またはリボフラビン／光照射処理したときの質量変化

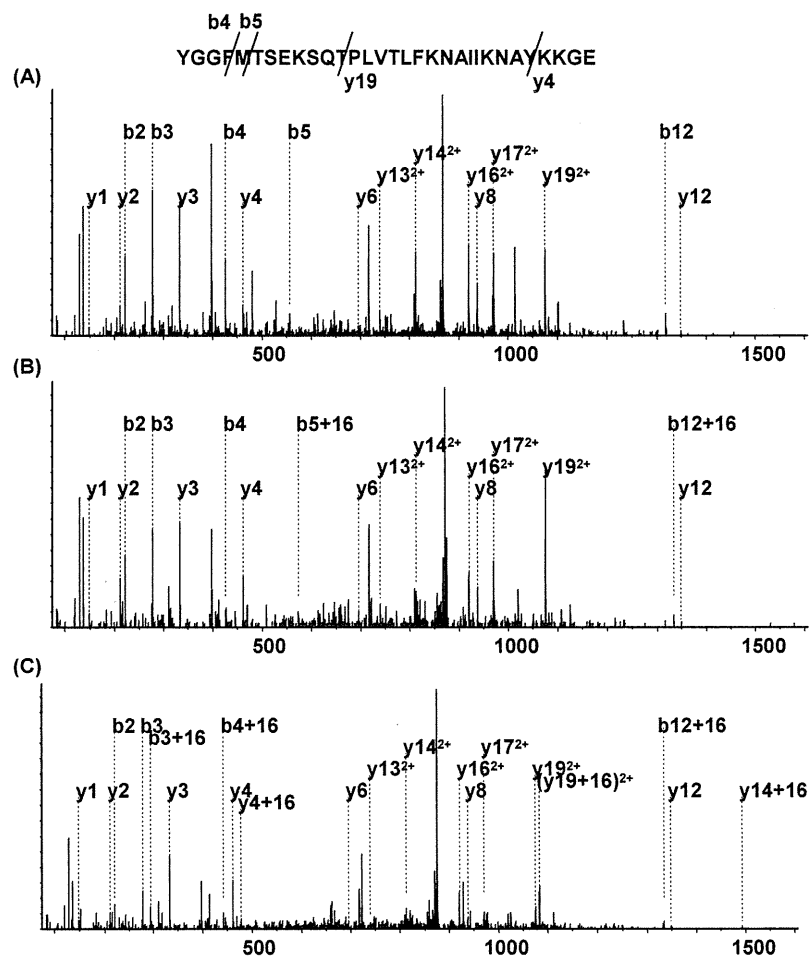
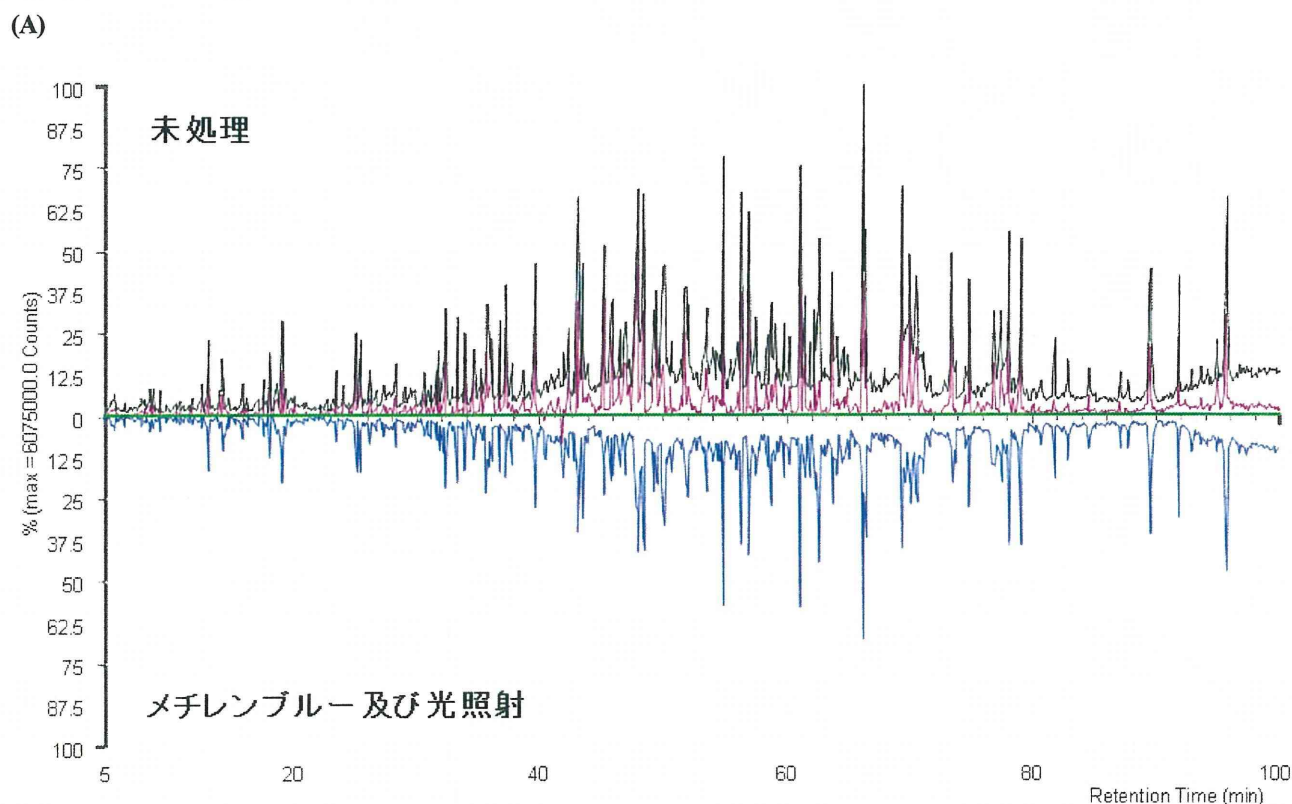


図4. β -エンドルフィン及びメチレンブルー／光照射後質量が16及び32増加した分子種のプロダクトイオンスペクトル(それぞれA、B及びC) 前駆イオンとして、 m/z 866.0, 870.0 及び 874.0 (+4) を用いた。



(B)

1	ATRR	YYLGAV	ELSWDYMOSD	LGELPVDAR	F	PPRVKSPFF	NTSVVYKCTL	1201	KETLIQENVV	LPQIHTVTGT	KNFMKNLFL	STRQNEGSY	DGAYAPVLQD
51	FVEFTDHLFN	IAKPRPPWVG	LLGPTTQAEV	YDTVVITLKN	MASHPVSLHA			1251	FRSLNDSTNR	TKKHTAHFSK	KGEENLEGL	GNQTKQIVEK	YACTTRISPN
101	VGVSYWKASE	GAEYDDQTSQ	REKEDDKVFP	GGSHTYVWQV	LKENGPMASD			1301	TSQQNFVTQR	SKRALKQFRL	PLEETELEKR	IIVDDTSTQW	SKNMKHLTPS
151	PLCLTYSYLS	HVDLVKDLNS	GLIGALLVCR	EGSLAKEKTQ	TLHKFILLFA			1351	TLTQIDYNEK	EKGAITQSPL	SDCLTRSHSI	PQANRSLPI	AKVSSFPSIR
201	VFDEGKSWHS	ETKNSLMQDR	DAASARAWPK	MHTVNGYVNR	SLPGLIGCHR			1401	PIYLTRVLFO	DNSSHLPAAS	YRKDQSGQVE	SSHFLQGAKK	NNLSLAILTL
251	KSVYVHVGIM	GTTPEVHSIF	LEGHTFLVRN	HRQASLEISP	ITFLTAQTLL			1451	EMTGDQREVG	SLGTSATNSV	TYKKVENTVL	PKPDLPKTSG	KVELLPKVHI
301	MDLGQFLFC	HISSHQHDGM	EAYVKVDSCP	EEPQLRMNN	EEAEYDDDL			1501	YQKDLFFTET	SNGSPGHLLD	VEGSLQGTGE	GAIKWNEANR	PGKVPFLRVA
351	TDSEMDVVR	F	DDDNSPSFIQ	IRSAVKKHPK	TWVHYIAAEE	EDWDYAPLVL		1551	TESSAKTPSK	LLDPLAWDNH	YGTQIPKEEW	KSQEKSPKPT	AFKKKDTILS
401	APDDRSYKQ	YLNNGPQRIG	RKYKVRVEMA	YTDFTFKTRE	AIQHESGILG			1601	LNACESNHAI	AAINEGQNKP	EIEVTWAKQG	RTERLCSQNP	PVLKRHQREI
451	PLLYGEVGD	LLIIFKNQAS	RPYNIYPHGI	TDVRLPYSR	LPKGVKHLKD			1651	TRTLQSDQE	EIDYDDTISV	EMKEDFDIY	DEDENQSPRS	FQKKTRHYFI
501	FPILPGEIFK	YKWTIVVEDG	PTKSDPRCLT	RYSSSFVNM	RDLASGLIGP			1701	AAVERLWDYG	MSSSPHVLNR	RAQSGSVQPF	KKVVFQFTD	GSFTQPLYRG
551	LLICYKESVD	QRGNQIMSDK	RNVILFSVFD	ENRSWYLTEN	IQRFLPNPAG			1751	ELNEHLGLLG	PYIRAEVDEN	IMVTFNQAS	RPYSFYSSLI	SYEEDQRQGA
601	VQLEDPEFQA	SNIMHSINGY	VFDSLQLSVC	LHEVAYWYIL	SIGAGTDFLS			1801	EPRKNFVKPN	ETKTYFWKVQ	HHMAPTKDEF	DKAWAYFSD	VDLEKDVHSG
651	VFFSGYTFKH	KMVYEDTLTL	PPFSGETVFM	SMENPGLWIL	GCHNSDFRNR			1851	LIGPLLCHVT	NTLNPAHGRQ	VTQVEALFHF	TIFDETSWY	FTENMERNCR
701	GMTALLKVSS	CDKNTGDYIE	DSYEDISAYL	LSKNAIEPR	SFSQNSRHPS			1901	APCNIQMEDP	TFKENYRPHA	INGYIMDTLP	GLVMAQDQRI	RWYLLSMGSN
751	TRQKQFNATT	IPENDIEKTD	PWFARHTPMP	KIQNVSSDDL	LMLLRQSPTP			1951	ENIHSIHFSG	HVFTVRKKEE	YKALYLNLYP	GVFETVEMLP	SKAGIWRVEC
801	HGLSLSDLQE	AKYETFSDDP	SPGAIDSNN	LSEMTFRPQ	LHHSQDMVFT			2001	LIGEHLHAGM	STLFLVYSNK	CQTPGLMASG	HIRDFQITAS	GQYQWAPKL
851	PESGLQLRLN	EKLGTAAATE	LKKLDFKVSS	TSNNLISTIP	SDNLAAGTDN			2051	ARLHYSGSIN	AWSTKEPFSW	IKVDLLAPMI	IHGKTQGAR	QKFSSLYISQ
901	TSSLGPPSPM	VHYDSQLDFT	LFGKKSSPLT	ESGGPLSLSE	ENNDSKLLES			2101	FIIMYSLDGK	KWQTYRGNST	GTLMVFFGNV	DSSGIKHNI	NPPIIARYIR
951	GLMNSQESSW	GKNVSSSTESG	RLFKGKRAHG	PALLTKDNAL	FKVSISLLKT			2151	LHPHYSIRS	TLRMLMGCD	LNSCSMPLGM	ESKAISDAQI	TASSYFTNMT
1001	NKTSNNSATN	RKTHIDGPSL	LIENSPSVWQ	NILESDFTEFK	KVTPLIHDRM			2201	ATWSPSKARL	HLQGRSNARW	PQVNNPEKWL	QVDFQKTMKV	TGVTTQGVKS
1051	LMDKNATALR	LNHMSNKTTS	SKNMEMVQKQ	KEGPIPPDAQ	NPDMSFFKML			2251	LLTSMYVKEF	LISSSQDGHQ	WTLFFQNGKV	KVFQGNQDSF	TPVNVSLDPP
1101	FLPESARWIQ	RTHGKNSLNS	GQGSPKQLV	SLGPEKSVEG	QNFLSEKNKV			2301	LLTRYLRIHP	QSWVHQIALR	MEVLGCEAQD	LY	
1151	VVGKGEFTKD	VGLKEMVFFS	SRNLFNTLND	NLHNNTHNQ	EKKIQEIEIK								

図5. 未処理及び光増感剤及び光照射処理血液第八因子のペプチドマップの比較
(A)対照とメチレンブルー及び光照射のペプチドマップの比較。(B) 帰属された酸化メチオニンを含むペプチド

表 1. ヒト血液凝固第 VIII 因子の LC/MS/MS で検出した N 結合型糖鎖結合糖ペプチド

Domain	Site	Position	Peptide sequence	Mass	Previously reported N-linked glycans	Composition of detected N-linked glycans					
A ₁ domain	42	37-47	SFPFNTSVVYK	1287.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	239	231-240	MHTVNGYVNR	1189.57	High mannose, Hybrid, and Complex	N2H5	N2H6	N2H7	N2H8	N3H5	N3H6
						N4H4	N4H5	N4H5F1	N3H4S1	N3H5S1	N3H6S1
A ₂ domain	582	572-583	NVILFSVFDENR	1451.74	Not glycosylated	Not glycosylated					
	757	755-768	QFNATTIPENDIEK	1618.78	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1				
B domain	784	782-795	IQNVSSDLLMLLR*	1587.87	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	828	813-858	YETFSDDPSPGAIDSNNLSEMTHFR*	5146.35	Complex	N4H5S2F1					
	900	878-925	VSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSM PVHYDSQLDTTLFGKK	4977.42	Complex	N4H5S2F1					
	943	926-946	SSPLTESGGPLSLSEENRDSK	2146.99	Not glycosylated	Not glycosylated					
	963	963-971	NVSSTESGR*	935.43	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	1001	1000-1002	TNK	361.20	Complex	Not detected					
	1005	1003-1011	TSNNSATNR	963.44	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1		
	1055	1050-1060	MLMDKNA TALR	1262.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
						N6H7S2F1	N6H7S3F1	N6H7S4F1			
	1066	1061-1067	LNHMSNK	842.41	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H5F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1
						N5H6S3F1					
	1185	1173-1192	NLFLTNLDNLHENNTHNQEK	2407.15	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1255, 1259	1253-1260	SLNDSTNR	905.42	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N8H10S2F2	N8H10S3F2	N9H11S3F2	
	1282	1271-1285	KGEEENLEGLGNQTK	1644.80	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	1300	1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR*	1618.81	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S3F1	N5H6S4F1	
	1384	1377-1385	SHSIPQANR	1008.51	Not glycosylated	Not glycosylated					
	1412	1407-1422	VLFQDNSSHLPAASYR	1803.89	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1442	1440-1457	KNNLSLAILTLEMTGDQR	2016.07	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1			
	1512	1504-1534	DLFPTETSNGLSPGHLDLVEGSLQGTGAIK	3181.58	Potential	??					
	1685	1675-1689	EDFDIYDEDENQSPR	1870.75	Not glycosylated	Not glycosylated					
A ₃ C ₁ C ₂	1810	1804-1813	KNFVKPNETK	1203.66	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1			
	2118	2117-2136	GNSTGTLMVFFGNVDSSGIK	2029.98	High mannose	N2H8	N2H9				

表 2. ヒト血液凝固第 VIII 因子の O 結合型糖鎖結合部位を含むと推定されたペプチド及び実際に検出した糖ペプチド

Domain	Position	Peptide sequence	Mass	Treated with PNGaseA and exoglycosydase		Oligosaccharide compositions (treated with or without PNGase A)			
B domain	769-781	TDPWFAHRTMPK	1582.77	N		N1H1S1	N1H1S2		
	782-795	IQDVSSSDLMLLR	1588.85	N		N1	N1H1	N1H1S1	N1H1S2
	796-812	QSPTPHGLSLSDLQEAK	1806.91	N		N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	(N1H1)2S3
	813-838	YETFSDDSPGAIDSDNSLSEMTHFR*	2917.23	N		N1H1S1			
	839-858	PQLHHSGDMVFTPE SGLQLR	2248.11	N		N1H1S1	N1H1S2		
	863-872	LGTTAATELK	1003.55	N	2N	N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	(N1H1)2S3
	947-962	LLESLMNSQESSWGK	1764.84	N		N1H1S2			
	1041-1049	KVTPLIHDR	1077.63	N		N1H1S3			
	1128-1136	QLVSLGPEK	969.55	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR	1618.81			N1H1S1	N1H1S2		
	1297-1310	ISPDTSQQNFVTQR*	1619.79	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1346-1360	HLTPSTLTQIDYNEK	1758.88	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1363-1376	GAITQSPLSDCLTR	1518.73	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1393-1406	VSSFPSIRPIYLTR	1634.91	N		N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	
	1458-1473	EVGSLGTSA TNSVTYK	1612.79	N	2N	N1H1S2			
	1474-14987	KVENTVLPKPDLPK	1576.92	N		N1H1S2			
	1504-1534	DLFPTETSDGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIK*	3182.56	N	2N	not detected			
	1549-1556	VATESSAK	791.40	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1561-1577	LLDPLA WDNHYGTQIPK	1980.01	N		N1H1S1	N1H1S2		

*, N 結合型糖鎖が結合していた糖ペプチド

T, S, 推定された O 結合型糖鎖結合部位

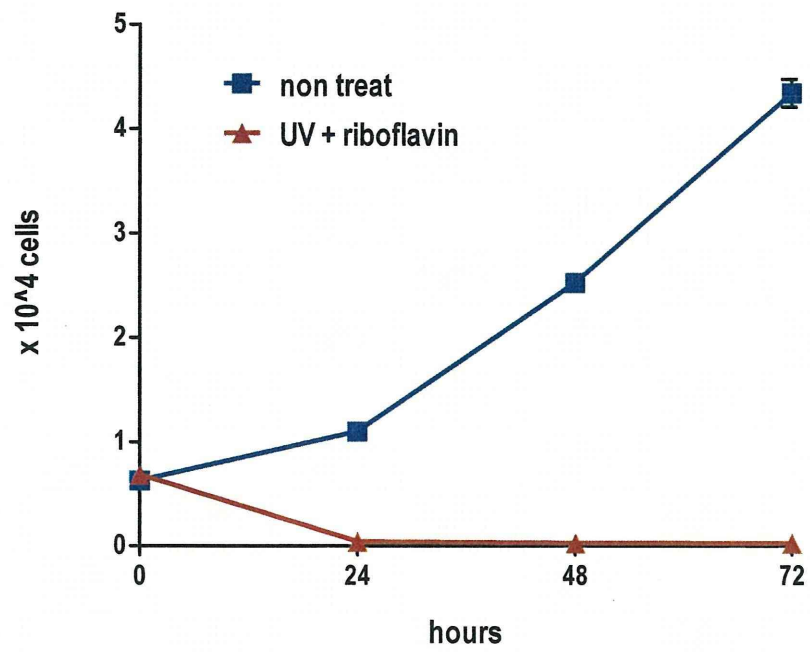


図 6. リボフラビン・UV 処理による白血球増殖抑制の確認

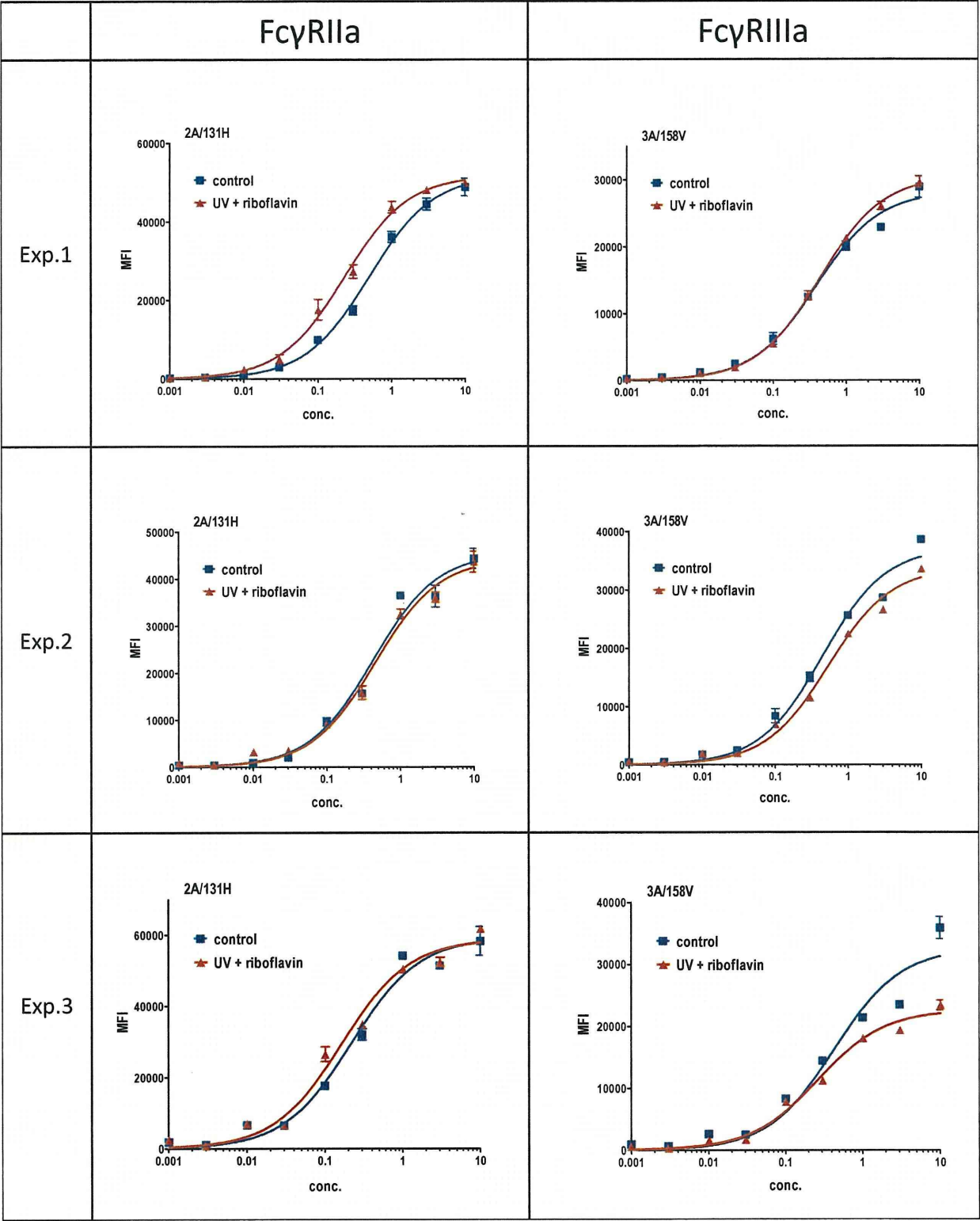


図 7. IgG の Fcγ受容体結合に対するリボフラビン・UV 処理の影響

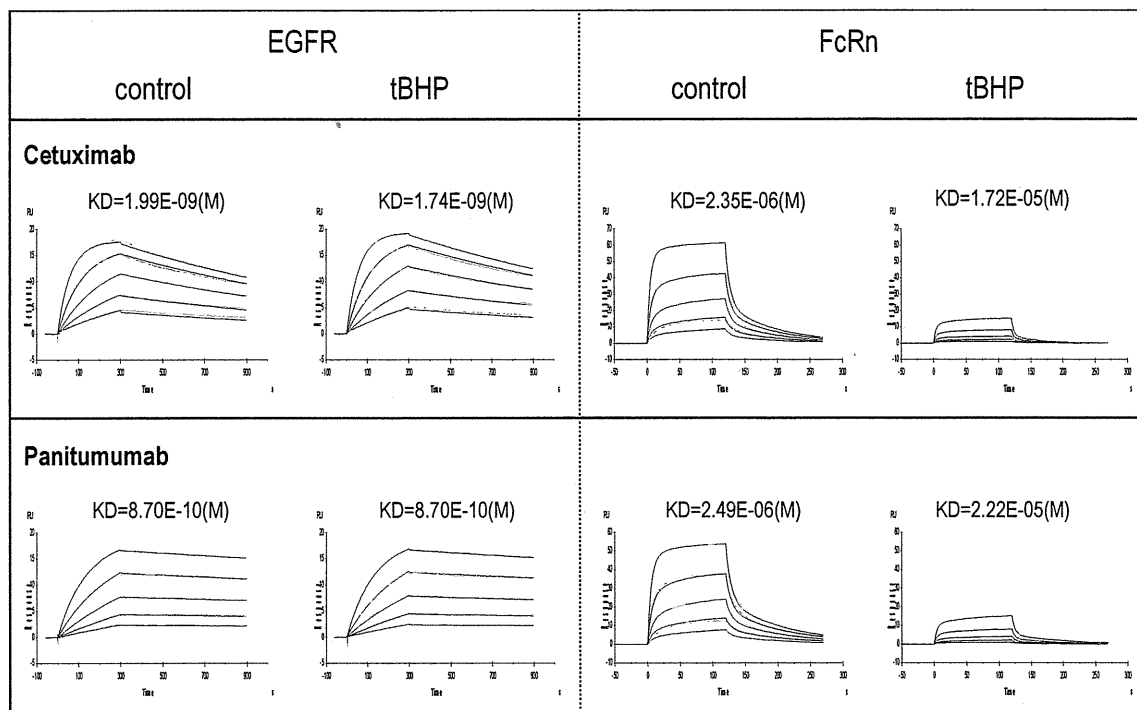


図 8. IgG の酸化が抗原 (EGFR) 結合, 及び, FcRn 結合能に及ぼす影響の検討

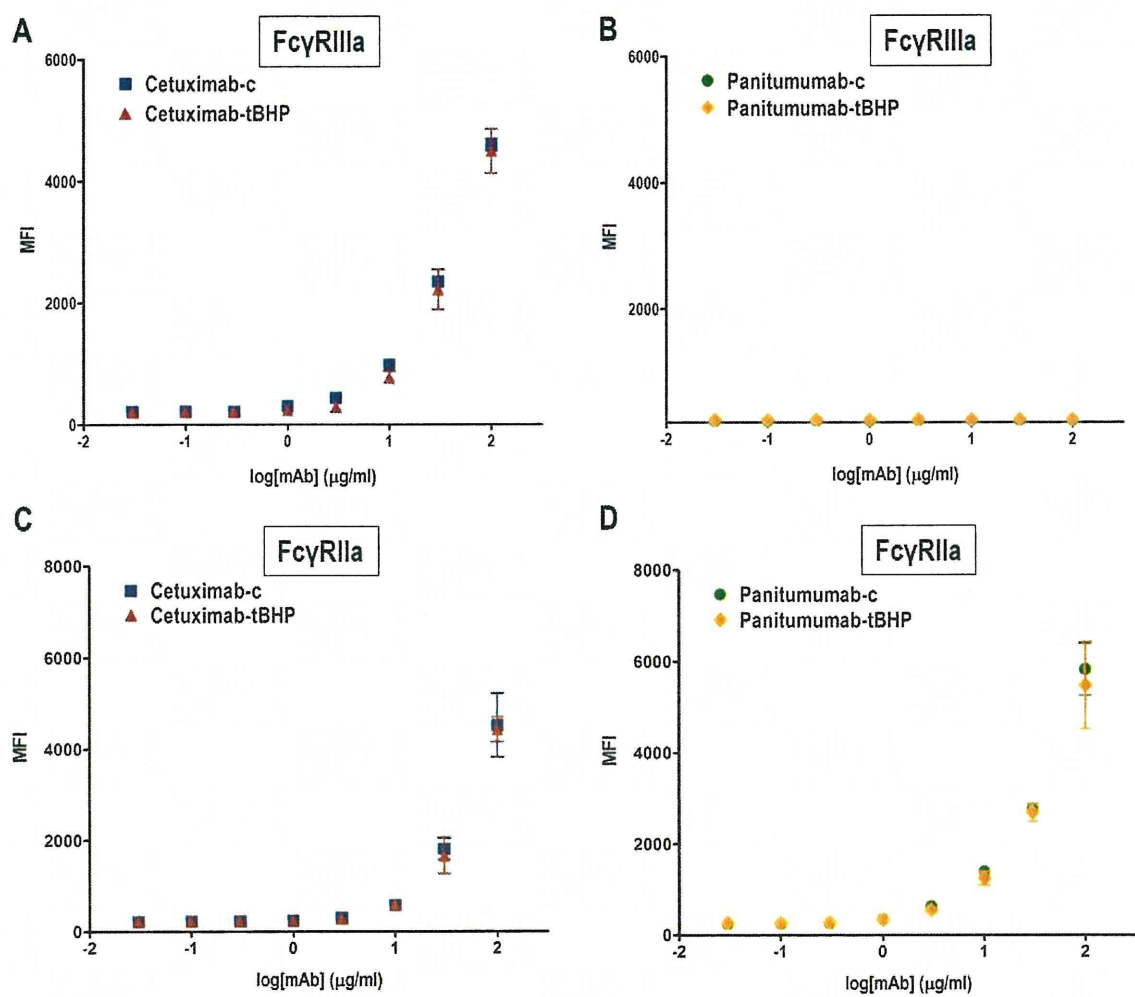


図 9. IgG の酸化が Fcγ受容体結合能に及ぼす影響の検討

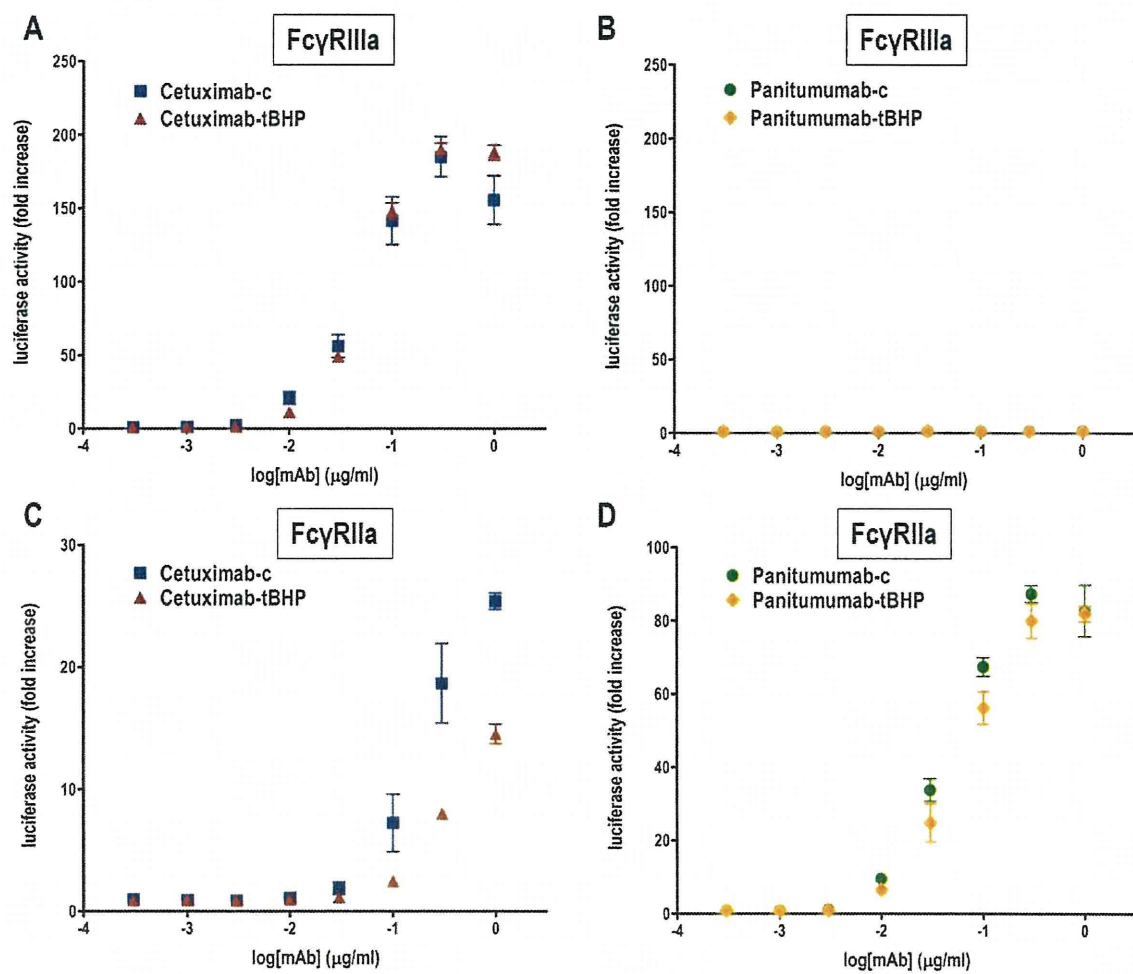


図 1 0 . IgG の酸化が Fcγ受容体活性化能に及ぼす影響の検討

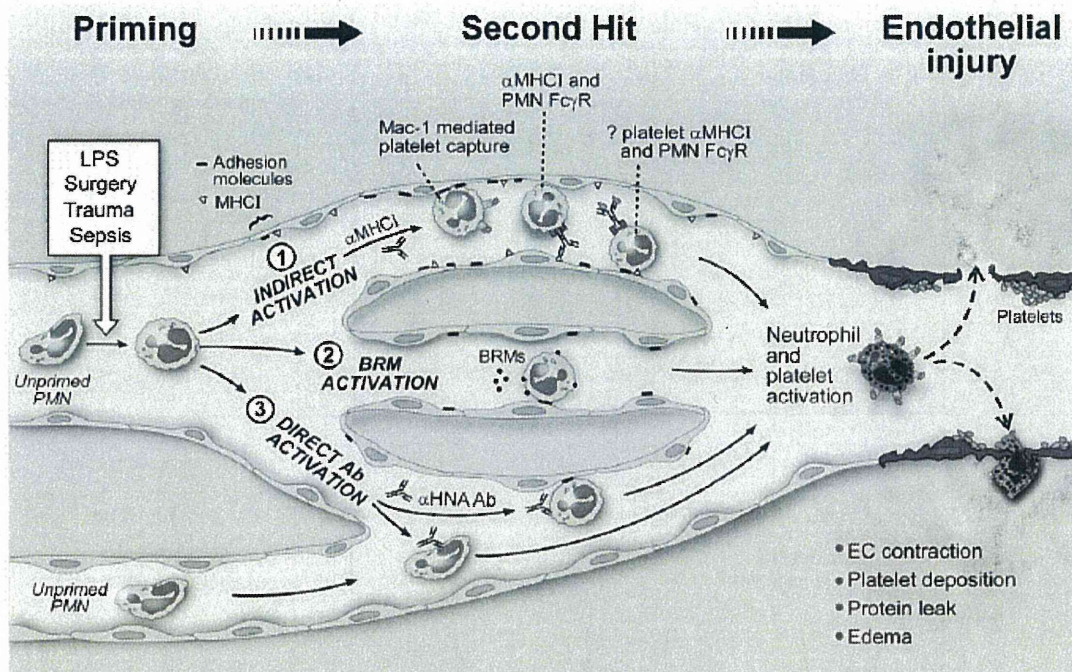


図 1 1. TRALI 発症機構に関する仮説
(Gilliss BM and Looney MR Transfusion Med. Rev. 25, 1, 2011)

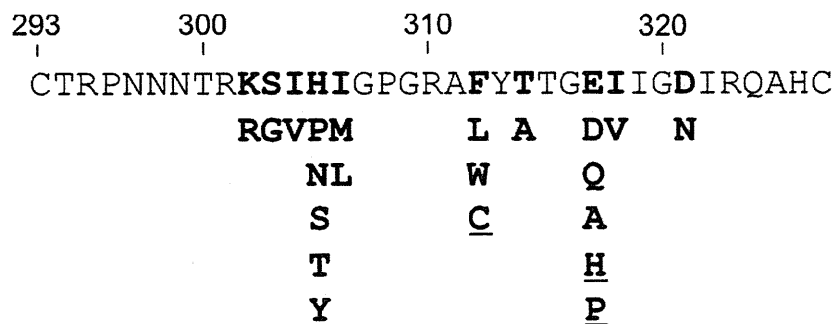


図 1 2. ヒトレトロウイルスエンベロープタンパク質の V3 部分に polymorphic なアミノ酸置換を導入し, V3 に関するウイルスライブラリーを作製した. この領域は, 標的細胞への侵入時にコレセプターと相互作用する.

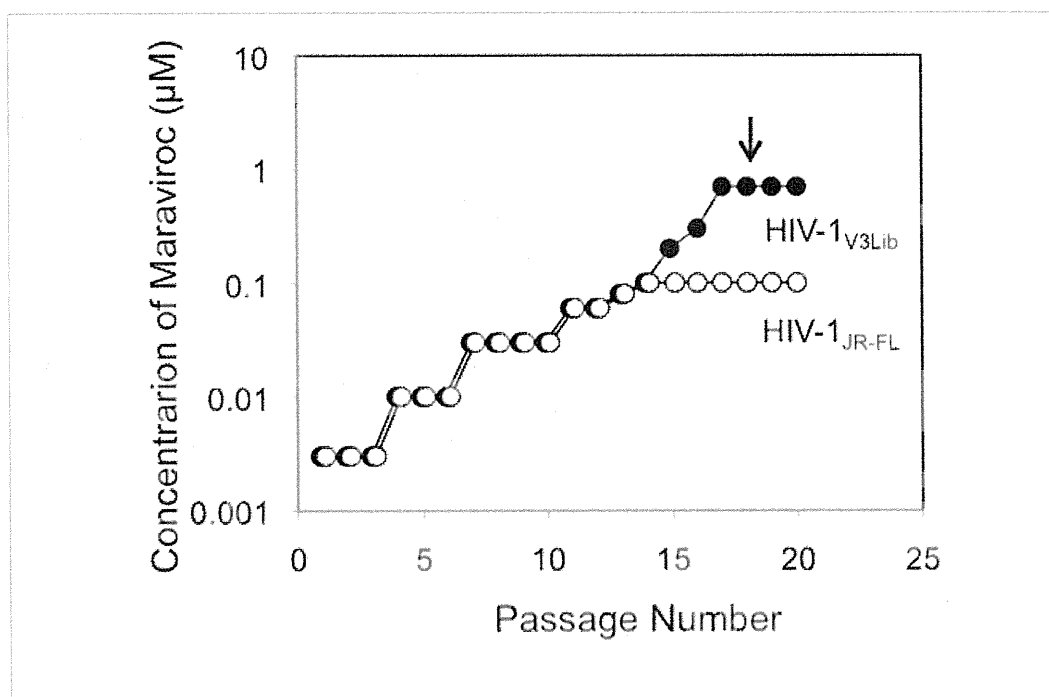


図 1 3. ここでは選択圧として薬剤を使い, 特異的な V3 構造をもつウイルスが選ばれてくるかどうかを調べた. 野生株に比べて, ライブラリーウイルスからは, 薬剤に強い抵抗性をもつウイルスが, 選択されてくることがわかる.

表 3 選択されたウイルスの薬剤感受性を調べると抵抗性を示した

	EC ₅₀ ^a (μM)	
	maraviroc ^b	TAK-779 ^b
HIV-1 _{JR-FL}	0.0069 ± 0.0019 ^c (1.0)	0.043 ± 0.009 (1)
HIV-1 _{JR-FL-p17}	0.055 ± 0.0055 (8)	0.15 ± 0.033 (3.5)
HIV-1 _{V3Lib}	0.0055 ± 0.0007 (0.8)	0.025 ± 0.007 (0.6)
HIV-1 _{V3Lib-p17}	> 10 (> 1449)	> 10 (> 233)

^a PM1/CCR5 cells were infected at 100 TCID₅₀ in the presence of the CCR5 inhibitor on day 0. Cytopathic effect was determined on day 6 by the MTT method.

^b Drug concentrations of 50% growth inhibition of the cells (CC₅₀) was > 10 μM.

^c mean ± SD (n = 3).

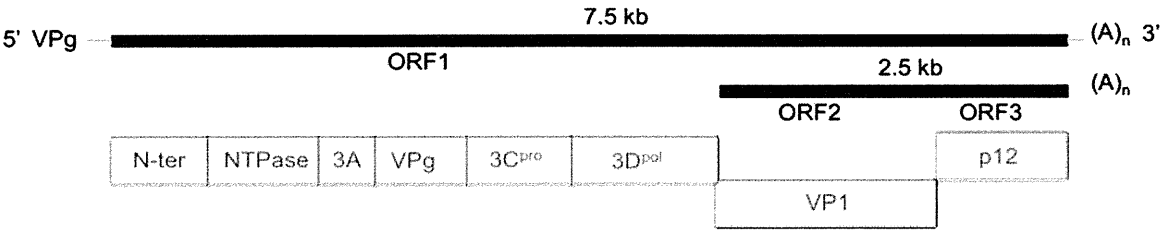


図 1 4. FCV のゲノム構造とウイルスタンパク質

表4 細胞のFCV感受性 (TCID₅₀)

cells	HeLa	293T	Jurkat	Vero	CV-1	NIH-3T3	CR-FK
virus							
poliovirus	10 ^{6.7}	10 ^{6.0}	<1	10 ^{7.3}	10 ^{6.0}	<1	<1
sindbis virus	ND	10 ^{6.7}	<1	10 ^{7.5}	10 ^{6.7}	10 ^{5.0}	10 ^{8.1}
FCV	<1	<1	<1	10 ^{4.0}	10 ^{3.7}	<1	10 ^{8.5}

*ND, not determined.

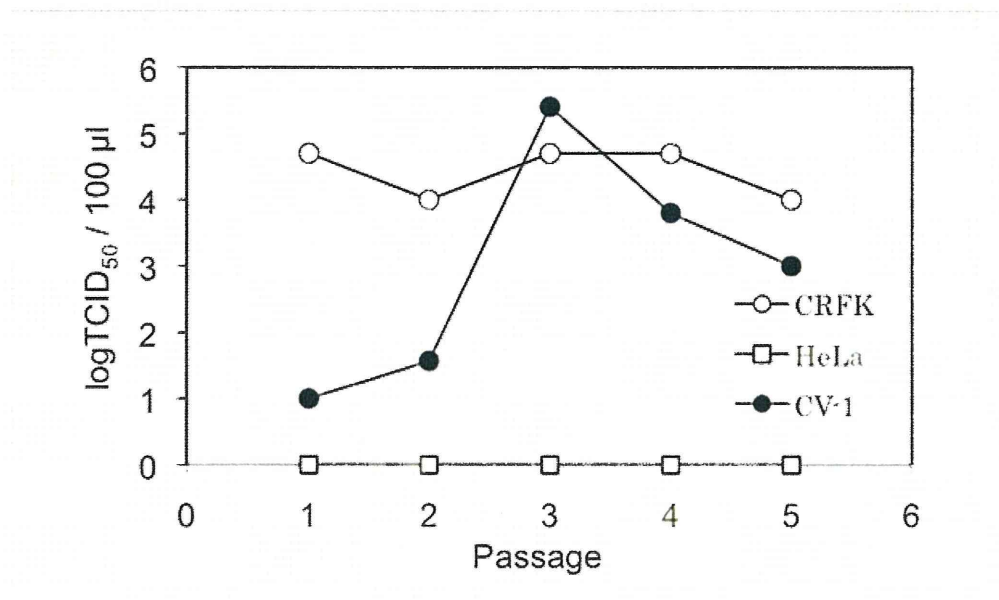


図 1 5. CV-1細胞による継代によるFCV の馴化

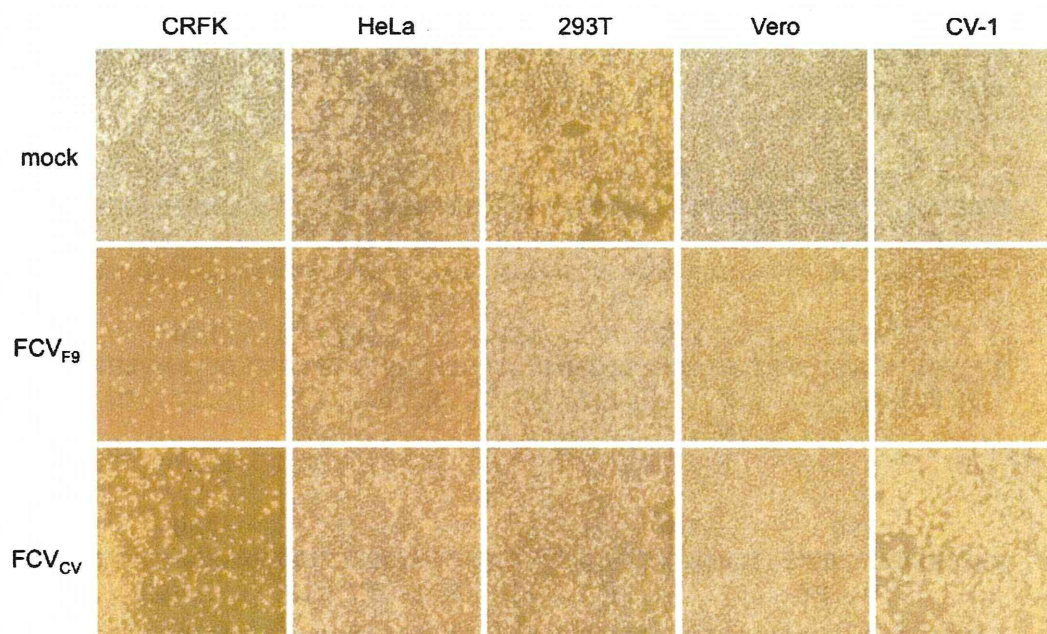


図 1 6. 分離したFCV_{CV} はCV-1細胞に感染し、強い細胞変性を引き起こす

ウイルス不活化技術の有効成分への影響評価に関する研究

研究分担者 原園 景

研究要旨 光化学反応を利用した新規ウイルス不活化法が血漿製剤の血液凝固因子活性の低下を引き起こすことが知られている。本研究の目的は、血液凝固第八因子を用いて、ウイルス不活化法がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を明らかにすることである。LC/MSを用いて遺伝子組換え血液凝固第八因子のペプチドマッピングを行い、19カ所分のN結合型糖鎖及び22カ所分のO結合型糖鎖付加したペプチドを含め、約90%のアミノ酸配列を確認した。次に、モデルペプチドを用いて、メチレンブルー/光照射及びリボフラビン/照射を行ったところ、認められた主な影響は、メチオニンの酸化体の形成であった。また、血液凝固第八因子で酸化を受けやすいメチオニン残基を確認した。

A. 研究目的

ウイルススクリーニングとして問診や血清学的検査に加えて核酸増幅検査が実施されるようになり、血液製剤のウイルスに対する危険性は、飛躍的に減少した。しかし、スクリーニング法の確立していないウイルスや未知の病原体に対する危険性には対応できないことから、様々な病原体不活化法が研究されてきた。血液製剤には大きく分けて、血漿分画製剤並びに輸血用血液製剤（全血製剤、赤血球製剤、血小板製剤及び血漿製剤）があるが、全ての製剤に適用可能な不活化技術は未だ確立されていない。血漿分画製剤においては、加熱処理、ソルベント/デタージェント（S/D）処理、ウイルス除去膜処理、及び各種分離精製処理等が開発されており、これらのいくつかの方法が組み合わされて用いられている。輸血用血液製剤においては、血小板製剤に対するソラレン/紫外線照射並びにリボフラビン/紫外線照射、また、血漿製剤に対するS/D処理、ソラレン/紫外線照射並びにメチレンブルー/光照射が開発されている。欧州ではこれらの方法がすでに実用化されているが、その導入は限定的である。また、米国では、現在の不活化技術が全ての感染源を不活化できるわけではないことから、承認されているものの不活化技術の導入は行われていない。我が国では、ソラレン、メチレンブルー及びリボフラビン等の光増感剤

及び光照射を用いたウイルス不活化法の導入の検討がなされているが、不活化処理に伴う製剤の有効成分への影響や不活化に伴う有害事象の発症についての懸念からまだ取り入れられていない。血液製剤の有効性/安全性確保のためには、ウイルス不活化技術の有効成分等への影響を評価する手法の開発が急務である。

光化学反応を利用したウイルス不活化の機序として、光照射による増感剤の活性化、もしくはそれによって生じた活性酸素による核酸等の傷害が考えられている。これらの操作は、タンパク質に対しても、切断、酸化、カルボニル化等の修飾を引き起こす可能性があると推測される。実際、これらの光増感剤及び光照射処理により、フィブリノゲン、第八因子（FVIII）などの一部の血液凝固因子の活性が15%前後低下することが報告されている。このような活性の低下は、操作に伴って高次構造が変化したことによるのか、または、タンパク質や糖鎖部分に何らかの修飾が生じたことによるのかを明らかにする必要がある。

そこで、本研究では、モデル血漿タンパク質として血液凝固第八因子（FVIII）を選択し、LC/MS/MSを用いたペプチドマッピングにより、その一次構造及び翻訳後修飾を最大限明らかにし、次に、メチレンブルー/光照射及びリボフラビン/紫外線照射に

より引き起こされるタンパク質の変化を明らかにする。

B. 研究方法

1. 試薬

組換えヒト FVIII は、コージネイト FS (バイエル薬品社) を使用した。修飾トリプシンはプロメガ社より、 α 2-3,6,8,9 ノイラミニダーゼ、 β 1-4 ガラクトシダーゼはシグマアルドリッチ社より、PNGaseA はロッシュ社より購入した。その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

2. 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

コージネイト FS は、PD10 カラム (GE ヘルスケア) で脱塩し、凍結乾燥した。水に溶解後、アセトン沈殿により界面活性剤を除去した。8 M 塩酸グアニジン、5 mM EDTA 及び 500 mM Tris を含む pH 8.5 の緩衝液 100 μ L に溶解し、1 M DTT を 4 μ L 加え、37°C、1 時間反応させ、その後、1 M ヨード酢酸ナトリウム 9.6 μ L を加え、45 分間、室温で反応させた。PD10 カラムで脱塩、凍結乾燥後、修飾トリプシンにて消化を行った。

3. PNGase A 及びエキソグリコシダーゼ消化

トリプシン消化物を 100°C、5 分加熱した後、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、37°C、12 時間 PNGase A 消化及び／もしくはノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ消化を行った。

4. 光増感剤及び光照射処理

ゲルろ過にて脱塩したコージネイト FS、モデルペプチドとして、 β -エンドルフィン (MW 3465.0) 及びアドレノメデュリン (MW 6028.7) を、5 μ M のメチレンブルーまたはリボフラビンを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、室温で 27W の白色蛍光灯から約 5 cm の距離に 30 分間放置した。

5. LC MS

LC 装置には、Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)、カラムには、MonoCap 0.1 X 250 mm (ジール

サイエンス)、質量分析装置に Qstar Elite (Applied Biosystem 社) を用いて、LC/MS/MS を行った。もしくは LC 装置には、Acquity UPLC システム (Waters 社)、カラムには、BEH300 C18 2.1 X 150 mm, 1.7 μ m (Waters 社) を、質量分析計に Synapt G2 HDMS (Waters 社) を用いて C/MS^Eを行った。

6. データベース検索

LC/MS/MS により得られた MS データを、マスコット検索エンジンを用いて、ヒト SwissProt データベース (ver. 51.3) に対して検索し、ペプチドを帰属した。MS の許容範囲を 1.2 Da、MS/MS の許容範囲を 0.6 Da に設定した。アミノ酸の可変修飾として、メチオニンの酸化 (+16.00)、チロシンの硫酸化 (+79.96) を設定した。シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化物の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として N-アセチルヘキソサミン付加 (+203.08) を設定した。 β 脱離及びマイケル付加した試料の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として脱水 (-18.01) と 2-メルカプトエタノール付加 (+60.00) を設定した。

7. LC/MS クロマトグラムの比較

LC/MS^E により得られたデータは、データ解析ソフトウェア Biopharmalynx を用いて解析及びクロマトグラム間の比較を行った。各ピークは SwissProt より得たヒト FVIII のアミノ酸配列 (FA8_HUMAN) に対して検索を行い、帰属した。アミノ酸の可変修飾として、メチオニンの酸化 (+16.00)、チロシンの硫酸化 (+79.96)、N 結合型糖鎖付加及び O 結合型糖鎖付加を適宜設定した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

C. 結果

1. FVIII のペプチドマップ

FVIII は、アミノ酸 2332 個からなる糖タンパク質

である。還元アルキル化及びトリプシン消化して得られた消化物を LC/MS/MS により分析した (図 1)。ペプチド及び糖ペプチドをできるだけ多く検出・帰属するために、質量分析の測定範囲を変えて、また PNGaseA 処理した試料などを複数回の分析を行った。ペプチドは、検索条件として、酵素：トリプシン、許容切断部位数：2、可変修飾：システインのカルボキシメチル化、メチオニンの酸化、チロシンの硫酸化、並びに PNGase A 処理した試料においては、N の D への変換 (+1 Da) を設定し、マスコット検索エンジンを用いたマスデータ解析により帰属した。通常、トリプシンは、K 及び R の C 末側が P である場合切断しないとされているが、一部切断される場合があることから、検索に当たってはその可能性も考慮した。その結果、複数のクロマトグラムのデータをあわせて、図 2 に示す一次配列を含むペプチドを確認した。

2. N 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

データ依存的に測定したプロダクトイオンスペクトル中に観測される m/z 204.1 の *N*-アセチルヘキサミンに由来するイオンを指標に糖ペプチドイオンを選択し、FVIII の *N* 結合型糖鎖に関する既報のデータを参照して帰属した。MS の測定範囲を m/z 400-2100、800-2100 及び 1000-2100 として分析した複数のクロマトグラムのデータを元に、検出された *N* 結合型糖鎖結合ペプチドを表 1 にまとめる。

FVIII には、25 カ所の推定 *N* 結合型糖鎖結合部位 (Asn42, 239, 582, 757, 784, 828, 900, 943, 963, 1001, 1005, 1055, 1066, 1185, 1255, 1259, 1282, 1384, 1412, 1442, 1512, 1685, 1810 及び 2118) が存在する。このうち Asn42, 239, 757, 784, 828, 900, 963, 1005, 1055, 1066, 1185, 1412, 1442, 及び 2118 に関しては、糖鎖が結合したペプチドのみが観測された。Asn1255 及び 1259 の両方を含むペプチドについては、糖鎖が 1 個及び 2 個結合した糖ペプチドとして検出された。Asn1282, 1300 及び 1810 を含むペプチドは、糖ペプチド及び糖鎖の結合していないペプチドの両方が観測された。Asn582, 943, 1384, 1685 は、ペプチドとしては観測さ

れたが、糖ペプチドとしては観測されなかった。Asn1001, 及び 1512 はペプチドとしても糖ペプチドとしても観測することはできなかった。

3. O 結合型糖鎖結合ペプチドの推定及び O 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

O 結合型糖鎖結合は、コンセンサス配列が十分明らかになっておらず、また、結合の有無は高次構造に左右されるため、実際に分析することにより確認する必要がある。トリプシン消化物において、約 10 カ所分の O 結合型糖鎖が結合した糖ペプチドを検出することができた (データ非表示)。図 1D に、O 結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを示す。しかし、糖ペプチドはイオン化効率が低いこと及び MS/MS で得られるフラグメントが少ないことから、検出及び帰属できていない O 結合型糖鎖が存在していると思われる。また、*N* 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドにも O 結合型糖鎖が結合している可能性もある。そこで、1) PNGase A による *N* 結合型糖鎖の除去、並びに 2) シアリダーゼ及びガラクトシダーゼによる O 結合型糖鎖のトリミングを単独もしくは組み合わせで行い、更なる O 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの帰属を試みた。

PNGaseA 処理及びエキソグリコシダーゼ処理した試料では、MS/MS の m/z 204.1 の EIC クロマトグラムでは O 結合型糖鎖のペプチド側の GalNAc だけが付加した糖ペプチドイオンのプロダクトイオンスペクトルが取得されていた。Ser 残基や Thr 残基に結合している HexNAc は解離しやすいため、CID-MS/MS によって結合部位を確認することはできなかったが、HexNAc 付加ペプチドは MS データの検索により容易に同定することができた。これらの結果から、22 箇所の O-結合型糖鎖結合ペプチドを確認した (表 2)。同定された推定 O 結合型糖ペプチドのうち、ペプチド I782-R795, Y813-R838 については、*N* 結合型糖鎖も結合すること、I1297-R1310 については、*N* 結合型糖鎖が結合する場合と結合しない場合があることが確認された。また、D1504-K1534 については、これまで検出できていなかったが、*N* 及び O 結合型糖鎖が結合していること